

РОЛЬ УРОВНЯ мРНК ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ Notch ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ФИБРОГЕНЕЗЕ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

ЩАСТНЫЙ А.Т.¹, ЛЕБЕДЕВА Е.И.¹, БАБЕНКО А.С.²

¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №2. – С. 25-37.

THE ROLE OF mRNA LEVEL OF THE Notch SIGNALING PATHWAY GENES IN INDUCED RAT LIVER FIBROGENESIS

SHCHASTNIY A.T.¹, LEBEDEVA E.I.¹, BABENKA A.S.²

¹Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2021;20(2):25-37.

Резюме.

Цель работы – изучить роль уровня мРНК генов сигнального пути Notch при индуцированном фиброгенезе печени крысы.

Материал и методы. Фиброз и цирроз печени у крыс Wistar индуцировали тиацетамидом в дозе 200 мг/кг веса животного два раза в неделю в течение 17 недель. Исследуемых крыс рандомизировали на 9 групп по 12 особей в каждой. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени изучали уровень мРНК генов notch1 и notch2 сигнального пути Notch и транскрипционных факторов hes1 и yap1 данного пути. Микроскопический анализ гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа OLYMPUS BX51. Степень фиброза оценивали по шкале Ishak K.G.

Результаты. Исследование классического транскрипционного фактора сигнального пути Notch – hes1 выявило очень низкую и стабильную его активность во всех изученных образцах. Анализ относительной динамики уровня мРНК генов notch1, notch2 и yap1 позволил установить заметные изменения их уровней в точке перехода от нормального состояния тканей печени к развитию фиброза.

Заключение. В рамках данного эксперимента ген hes1 не является мишенью пути Notch и может быть использован в качестве референсного гена. Отмеченное снижение экспрессии активности yap1, вероятно, ингибирует компенсаторно-восстановительные процессы в печени, активирует звездчатые клетки и способствует трансформации фиброза в цирроз. Выявленные колебания уровней мРНК генов notch1 и yap1 по отношению к стартовой точке (нет изменений в ткани печени) достаточно точно описывают период начала перехода развитого фиброза в цирроз и на основании этого могут рассматриваться как потенциальные маркеры перехода фиброза в цирроз.

Ключевые слова: крысы Wistar, тиацетамид, фиброгенез печени, гены notch1, notch2, hes1, yap1, морфология.

Abstract.

Objectives. To study the role of mRNA level of the Notch signaling pathway genes in induced rat liver fibrogenesis.

Material and methods. Fibrosis followed by the transition to liver cirrhosis in rats of Wistar line was induced with thioacetamide at a dose of 200 mg/kg of animal body weight twice a week for 17 weeks. The rats were randomized into 9 groups of 12 animals each. The mRNA level of the Notch signaling pathway genes was assessed by real-time PCR. The notch1, notch2, yap1 and hes1 genes were used as molecular targets. Microscopic analysis of histological preparations was performed using the OLYMPUS BX51 microscope. The degree of fibrosis was assessed according to the scale of Ishak K.G.

Results. The study of the classical transcription factor of the Notch signaling pathway, hes1, revealed its very low and stable activity in all studied samples. The analysis of relative dynamics of the mRNA level of the notch1, notch2, and yap1

genes made it possible to determine marked changes in their levels at the point of transition from the normal state of liver tissues to the development of fibrosis.

Conclusions. Within the framework of this study, the *hes1* gene is not a target of the Notch pathway and can be used as a reference gene. The noted decrease in the mRNA level of the *yap1* gene, probably, inhibits the compensatory-restorative processes in the liver, activates the stellate cells, and promotes the transformation of fibrosis into cirrhosis. In addition, it has been found that the revealed fluctuations in the mRNA levels of the *notch1* and *yap1* genes in relation to the starting point (there are no changes in the liver tissue) quite accurately describe the period of the onset of the transition of advanced fibrosis to cirrhosis. In this regard, they can be considered as potential markers of the transition of fibrosis to cirrhosis.

Key words: *Wistar rats, thioacetamide, liver fibrogenesis, genes notch1, notch2, hes1, yap1, morphology.*

Прогрессирующий фиброз печени приводит к возникновению цирроза, печеночной недостаточности, гепатоцеллюлярной карциномы и представляет собой серьезную проблему для здравоохранения во всем мире [1, 2]. Ежегодно в мире от цирроза печени умирает более миллиона человек. Он занимает 11-ое место среди наиболее частых причин смертности [3]. На протяжении многих лет фиброз и цирроз печени являются областью интенсивных исследований и открытий [1, 4, 5]. При этом эффективных антифибротических препаратов до сих пор нет, и трансплантация печени остается единственным радикальным методом лечения при декомпенсированном циррозе. Следовательно, первостепенной задачей является понимание молекулярных механизмов, контролирующих регенерацию печени при хронических заболеваниях, определение вовлеченных в данный процесс сигнальных путей и поиск биомаркеров для ранней диагностики и лечения [3, 6, 7].

Сигнальный путь Notch является одним из наиболее широко используемых природой путей. Он вовлечен в клеточную пролиферацию и дифференцировку, апоптоз, неоангиогенез, формирование клеточных ниш и другие процессы. Исследования последних лет свидетельствуют о связи данного пути с развитием ряда заболеваний у человека. В частности, выявлено его участие в регуляции дифференцировки миофибробластов при фиброзе легких, почек, сердца и печени [8, 9].

У млекопитающих выделяют четыре белка-рецептора семейства Notch (Notch1-4), три лиганда Delta-like (Dll1, Dll3 и Dll4) и два лиганда Serrate/Jagged (Jag1 и Jag2) пути Notch. В интактной печени гепатоциты, синусоидальные эндотелиальные клетки и холангиоциты характеризуются высоким уровнем мРНК генов *notch1* и *notch2* и низким уровнем мРНК генов *notch4* и *notch3*. Ген *jag1* обнаруживается только в гепатоцитах, а холангиоциты и синусоидальные эндотелиальные клетки экс-

прессируют только *jag1* и *dll1*. Экспрессия *jag2*, *dll1* и *dll3* отсутствует в здоровой печени [10]. Запуск сигнального пути происходит по юкстакриновому механизму. При связывании рецептора с лигандом двух контактирующих клеток происходят последовательные процессы протеолитического расщепления трансмембранного рецептора и отщепление от него внутриклеточного домена NICD. Затем NICD перемещается в ядро, взаимодействует с ДНК-связывающим фактором транскрипции RBP-J κ и активатором MAML1-3. При отсутствии внутриклеточного домена NICD фактор транскрипции RBP-J κ связывается с репрессорами и подавляется транскрипция генов сигнального пути Notch. Наиболее изученными мишенями данного пути являются гены *hes* и *hey* [9, 10].

Анализ научной литературы показал, что роль сигнального пути Notch при фиброгенезе печени до конца не исследована, а сведения об уровне мРНК генов *notch1* и *notch2* при хронических заболеваниях печени противоречивы. При культивировании в звездчатых клетках выявлено снижение уровня мРНК *notch1* и *hes1* [11]. В другом исследовании показано, что вирус гепатита В вызывает повышение экспрессии *notch1* во внутрипеченочных Т-клетках при циррозе [12]. У пациентов с первичным билиарным циррозом печени и гепатоцеллюлярной карциномой геномный анализ выявил высокий уровень мРНК генов, включенных в сигнальный путь Notch [13]. При фиброзе печени у крыс, индуцированном четыреххлористым углеродом, уровень мРНК *notch1* и *notch2* не проявили заметных изменений, по сравнению с контролем [14, 15].

В настоящее время известно, что практически на всех этапах фиброгенеза сигнальный путь Notch взаимодействует с компонентами других сигнальных путей, таких как Hippo, Wnt/ β -catenin, TGF β и Hedgehog. Несомненно, в будущем данный список будет расширен [9]. Сигнальный

путь Hippo является основным регуляторным механизмом размера органов у животных. Однако молекулярный механизм, регулирующий пролиферацию, дифференцировку клеток и апоптоз, до конца не изучен. В последнее время увеличение органа в размере и образование опухоли связывают с гиперэкспрессией Yes1-ассоциированного регулятора транскрипции (yap1) [16, 17]. В печени ген yap1 сигнального пути Hippo является Notch-зависимым геном. Показана ключевая роль yap1 в регуляции клеточного цикла и дифференцировке холангиоцитов и гепатоцитов во время эмбрионального развития печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Сообщалось о высокой экспрессии yap1 после частичной гепатэктомии, а также в активированных звездчатых клетках печени пациентов и экспериментальных животных при фиброзе. В недавних исследованиях выявлено, что ингибирование yap1 приводит к обильному синтезу внеклеточного матрикса и развитию фиброза. Ряд исследователей предполагает, что путь Notch и yap1 активируют sox9, а это приводит к активации звездчатых клеток и индукции фиброза. Исследование изменения активности сигнального каскада пути Notch имеет важное терапевтическое значение при лечении фиброза и представляет перспективное направление для разработки новых антифибротических препаратов [9, 16, 17].

Цель работы – изучить роль уровня мРНК генов сигнального пути Notch при индуцированном фиброгенезе печени крысы.

Материал и методы

В эксперименте использовали 117 половозрелых крыс-самцов Wistar весом от 190-210 г, прошедших карантинный режим вивария и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Фиброз и цирроз печени у животных индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамидом, который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в неделю за 3 часа до кормления в течение 17 недель.

Исследуемых крыс рандомизировали на 9 групп по 12 особей в каждой (m0 – контрольная, m1 – длительность воздействия тиацетамидом 3 недели, m2 – длительность воздействия тиацетамидом 5 недель, m3 – длительность воздействия тиацетамидом 7 недель, m4 – длительность воздействия тиацетамидом 9 недель, m5 – длительность

воздействия тиацетамидом 11 недель, m6 – длительность воздействия тиацетамидом 13 недель, m7 – длительность воздействия тиацетамидом 15 недель, m8 – длительность воздействия тиацетамидом 17 недель). Опытных крыс выводили из эксперимента через 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17 недель, а интактных – по окончании эксперимента. В ходе эксперимента погибло 9 животных. Протокол-дизайн эксперимента на крысах был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019).

Выделение суммарной РНК из исследуемых образцов печени и синтез кДНК на матрице суммарной РНК

Забор биологического материала проводили непосредственно после декапитации животного. Скальпелем из большой левой доли печени крыс забирали фрагменты органа диаметром не более 5 мм. После забора образцы помещали в криопробирки и далее в жидкий азот для транспортировки и хранения непосредственно до начала процедуры выделения РНК.

Выделение суммарной РНК проводили с помощью набора реагентов «АртРНК MiniSpin» (ООО «АртБиоТех», Беларусь) согласно протоколу производителя. Гомогенизацию нативных образцов печени проводили с использованием фарфоровых ступок и пестиков в присутствии жидкого азота, не допуская размораживания ткани. Затем в ступку с перетертым до состояния пудры образцом вносили раствор, содержащий ингибиторы РНКаз и хаотропные агенты (сорбирующий раствор из набора для выделения РНК) для повышения качества последующего лизиса и минимизации деградации РНК. Повторно растирали образец, испаряли жидкую фракцию азота и помещали пудру в свободные от РНКаз полипропиленовые пробирки.

После процедуры выделения и очистки суммарную РНК сбивали с мини-колонок с помощью свободной от РНКаз milliQ воды, входящей в состав набора.

Контроль качественных характеристик образцов проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (выборочно) без денатурирующих условий (1x TAE, 2% гель). Количество суммарной РНК после выделения определяли с

помощью спектрофотометрии (длина волны 260 нм). Выборочно снимали спектр поглощения 220-340 нм.

Синтез кДНК проводили с использованием олиго дТ праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Беларусь) в соответствии с инструкцией производителя. Для одной реакции использовали одинаковое стартовое количество суммарной РНК 200 нг/реакцию.

Дизайн олигонуклеотидных праймеров для оценки уровня мРНК генов-мишеней

Для дизайна специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов использовали данные о последовательностях мРНК генов, депонированные в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). В качестве кандидатов в референсные гены для оценки относительного уровня экспрессии на основании данных литературы были выбраны: Rpl1, Sdh и Hprt. В качестве мишеней были выбраны:

1. notch1: Notch1 – рецептор notch 1, notch receptor 1.
2. notch2: Notch2 – рецептор notch 2, notch receptor 2.
3. yap1: Yap1: Yes1-ассоциированный регулятор транскрипции, Yes1 associated transcriptional regulator.
4. hes1: Hes1 – фактор транскрипции bHLH семейства hes, hes family bHLH transcription factor 1.

В случае наличия нескольких изоформ мРНК перед началом дизайна проводили их выравнивание с помощью бесплатного программного пакета Ugene v.33 (UniPro, Россия). Для дизайна использовали консервативные участки последовательности мРНК с соблюдением правила о размещении одного или более олигонуклеотидов в месте соединения 2 разных экзонов.

Первичный дизайн проводили с помощью бесплатного онлайн приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Уникальность и специфичность полученных олигонуклеотидов проверяли с помощью онлайн сервиса Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ наличия стабильных димеров и шпилечных структур олигонуклеотидов и ампликонов, а также моделирование оптимальных условий проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) осуществляли с помощью бесплатного онлайн-программного пакета mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) и бесплатного онлайн-приложения

OligoAnalyser (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Последовательности олигонуклеотидов представлены в таблице 1.

Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Для проведения ПЦР-РВ использовали реагенты производства ОДО «Праймтех», Беларусь. Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях: 2 мМ хлорида магния, 0,1 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1,25 ед. термостабильной Taq ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором.

Режим термоциклирования: +95°C – 2 минуты, затем 40 циклов: +95°C – 5 сек, +60°C – 45 сек. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали оборудование производства компании BioRad (прибор CFX96touch, США). Критерием успешной оптимизации считали наименьший показатель цикла амплификации. Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений, концентрированных образцов кДНК. Шаг 5 раз. Критерием удовлетворительной эффективности считали не менее 90%. Для определения уровня экспрессии генов проводили ПЦР-РВ согласно оптимизированным протоколам для всех мишеней и кандидатов в референсные гены. Все реакции проводили в триплетах. В каждой экспериментальной и контрольной группах все 12 образцов анализировали отдельно для получения наибольшей достоверности и учета внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов.

Гистологические методы исследования

Для проведения морфологического исследования образцы печени крыс помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 часов. После чего проводили гистологическую обработку фиксированного материала по стандартной методике с последующей заливкой в парафин, изготовлением гистологических срезов и их окраской гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – методом Маллори в автоматическом программируемом приборе для цитологических и гистологических методик. Микроскопический анализ гистологических пре-

Таблица 1 – Последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов

Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
notch1F	GTGTCCCAAAGGCTTCAGC		
notch1R	CGTTCTTGCATGGTGTGCT		
notch1P	GGGCACCTGTGCCAGTATGA	FAM	BHQ1
notch2F	CCCTGGTTTCACAGGACCA		
notch2R	TTCAGGCAGGGAGTACTGGA		
notch2P	GTGCCAGATCGACATTGACGAC	FAM	BHQ1
hes1F	GAAAGATAGCTCCCGGCATT		
hes1R	CGGAGGTGCTTCACTGTGCAT		
hes1P	CCAAGCTGGAGAAGGCAGACA	FAM	BHQ1
yap1F	CTGCCTCAGGGCCTCTT		
yap1R	TGTGGTCTTGTTCTTATGGTTTATG		
yap1P	GGATGGGAGCAAGCCATGAC	FAM	BHQ1
hprtF	GGACAGGACTGAAAGACTTGCT		
hprtR	ACAGAGGGCCACAATGTGAT		
hprtP	CATGAAGGAGATGGGAGGCC	FAM	BHQ1
rpl1F	CCTTATACAACAGGACTCAGGCTA		
rpl1R	ACTGCAAGTCTTTGAGTCCAGA		
rpl1P	GAAAATTTTGACTACCCTGCCTGG	FAM	BHQ1
sdhaF	CCCACAGGTATCTATGGTGCT		
sdhaR	TTGGCTGTTGATGAGAATGC		
sdhaP	CATCACAGAAGGGTGCCGTG	FAM	BHQ1

паратов проводили с использованием микроскопа OLYMPUS BX51. Оценку степени фиброза проводили с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G. [18].

Результаты и обсуждение

Морфологический анализ

Морфологический анализ печени опытных крыс выявил развитие фиброза печени с трансформацией в цирроз. Через 15 недель после начала эксперимента на всех гистологических срезах отмечены: тотальное образование ложных узелков разной величины и формы; выраженное диффузное разрастание соединительнотканых септ; формирование новых узелков за счет разделения крупных ложных долек тонкими соединительноткаными септами; выраженный диффузный портальный и перипортальный фиброз; диффузный перигепатоцеллюлярный и перидуктальный

фиброз. В таблице 2 приведена оценка степени фиброза печени экспериментальных животных с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G.

Нормализация данных ПЦР-РВ

Анализ стабильности экспрессии генов-кандидатов и генов-мишеней проводили с использованием бесплатного онлайн-приложения RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). Согласно данным анализа ни один из выбранных генов-кандидатов не отвечал требованиям к оптимальным референсным генам: уровень мРНК генов-кандидатов изменялся в 2 и более раз в ходе эксперимента, отвечая на изменения условий наряду с генами-мишенями; вариация уровня мРНК внутри 1 экспериментальной группы от животного к животному составляла 2 и более цикла. При этом ген-мишень *hes1* не показал ответа на экспериментальное воздействие в течение всего периода на-

Таблица 2 – Оценка степени фиброза печени экспериментальных животных

Группы животных	Балльная оценка степени фиброза печени по шкале Ishak K.G.	Гистологическая характеристика степени выраженности фиброза
m0	F0	Фиброз отсутствует
m1	F1	Фиброзное расширение портальных трактов с короткими фиброзными септами или без них
m2	F2/F3	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с короткими фиброзными септами или без них. Единичные мостовидные порто-портальные септы
m3	F3/F4	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с единичными мостовидными порто-портальными септами, местами с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрными септами
m4	F4/F5	Период трансформации фиброза в цирроз. Фиброзное расширение большинства портальных трактов с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрными септами. Диффузная нодулярная перестройка паренхимы (неполный цирроз)
m5	F5	
m6	F5/F6	Точка перехода фиброза в цирроз. Многочисленные мостовидные септы с единичными узелками (неполный цирроз). Достоверный цирроз
m7	F6	Достоверный цирроз
m8	F6	

блюдений (17 недель), а вариация уровня его мРНК внутри одного эксперимента от животного к животному варьировала в пределах 1 цикла. При анализе всех значений циклов ПЦР-PB Cq (Cq – quantitation cycle) также была выявлена вариация гена-мишени *hes1* менее 1 цикла. В связи с этим было принято решение проводить нормализацию данных ПЦР-PB с использованием в качестве референсного гена – *hes1*. Стоит отметить, что по данным литературы уровень мРНК *hes1* изменяется при резекции печени и других заболеваниях [9-11]. Полученные данные дают основание полагать, что при фиброгенезе печени крыс, индуцированном тиацемидом ген *hes1* не является мишенью пути Notch или по иным причинам не реагирует на условия эксперимента. Предположительно, выявленное противоречие зависит от перекрывания сигнального пути Notch с другими сигнальными путями, от клеточного контекста, дизайна эксперимента и других неисследованных факторов. Для анализа уровня мРНК генов-мишеней *notch1*, *notch2* и *уар1* использовали метод 2^{-ddCt} [19].

Динамика уровня мРНК генов-мишеней под действием экспериментальных условий

В рамках экспериментального воздействия

уровень мРНК генов *notch1* и *уар1* изменился незначительно с максимальным эффектом в точке m5 – падение уровня мРНК *notch1* в 3 раза, уровня мРНК *уар1* в 3,3 раза. При этом уровень мРНК гена *notch2* практически не изменялся в ходе всего эксперимента – падение на 64% (точка m7), рост на 13% (точка m4). Изменения уровня мРНК менее 2 раз не считали значимыми и относили к погрешности измерения. Динамика уровня мРНК генов *notch1*, *notch2* и *уар1* представлена на рисунке 1.

Согласно данным литературы Notch-зависимый ген *уар1*, входящий в состав сигнального пути Hippo (регулирует размер органов путем усиления апоптоза и снижения пролиферации клеток), играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла и дифференцировки холангиоцитов и гепатоцитов. Сообщалось о высокой экспрессии *уар1* после частичной гепатэктомии, а также в активированных звездчатых клетках печени пациентов и экспериментальных животных при фиброзе. В недавних исследованиях показано, что ингибирование *уар1* приводит к обильному синтезу внеклеточного матрикса и развитию фиброза [9, 17, 18].

Данные о падении уровня мРНК *уар1*, полученные в настоящем исследовании, могут

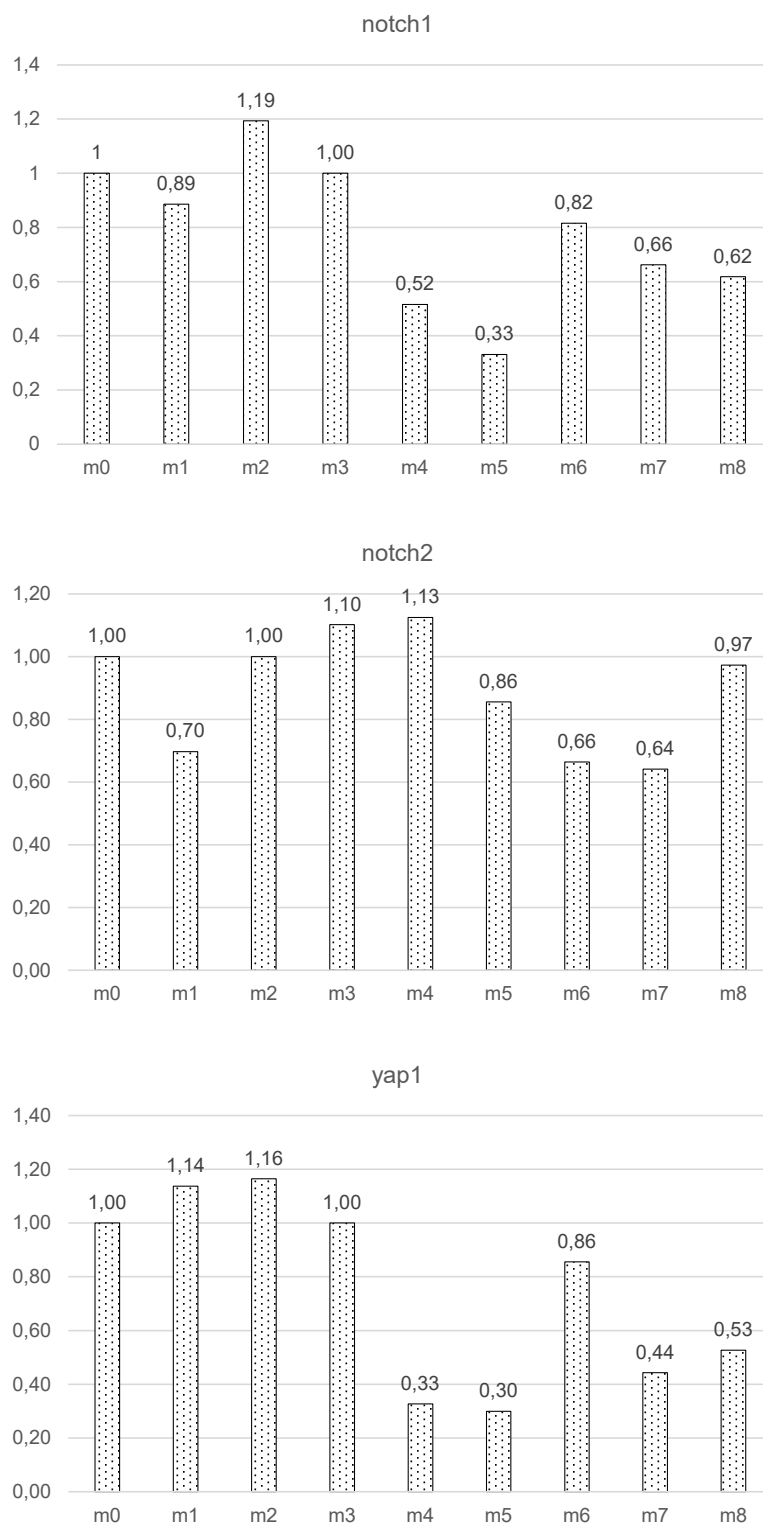


Рисунок 1 – Динамика уровня мРНК генов notch1, notch2, уар1 в ответ на экспериментальные условия.
Данные выражаются в относительных единицах по отношению к уровню мРНК в точке m0.

указывать на то, что пока неизвестные факторы, стимулирующие развитие фиброза, оказывают ингибирующее действие на уровень мРНК уар1.

Анализ относительной динамики уровня мРНК генов notch1, notch2 и уар1
Выражение уровня мРНК генов-мишеней в

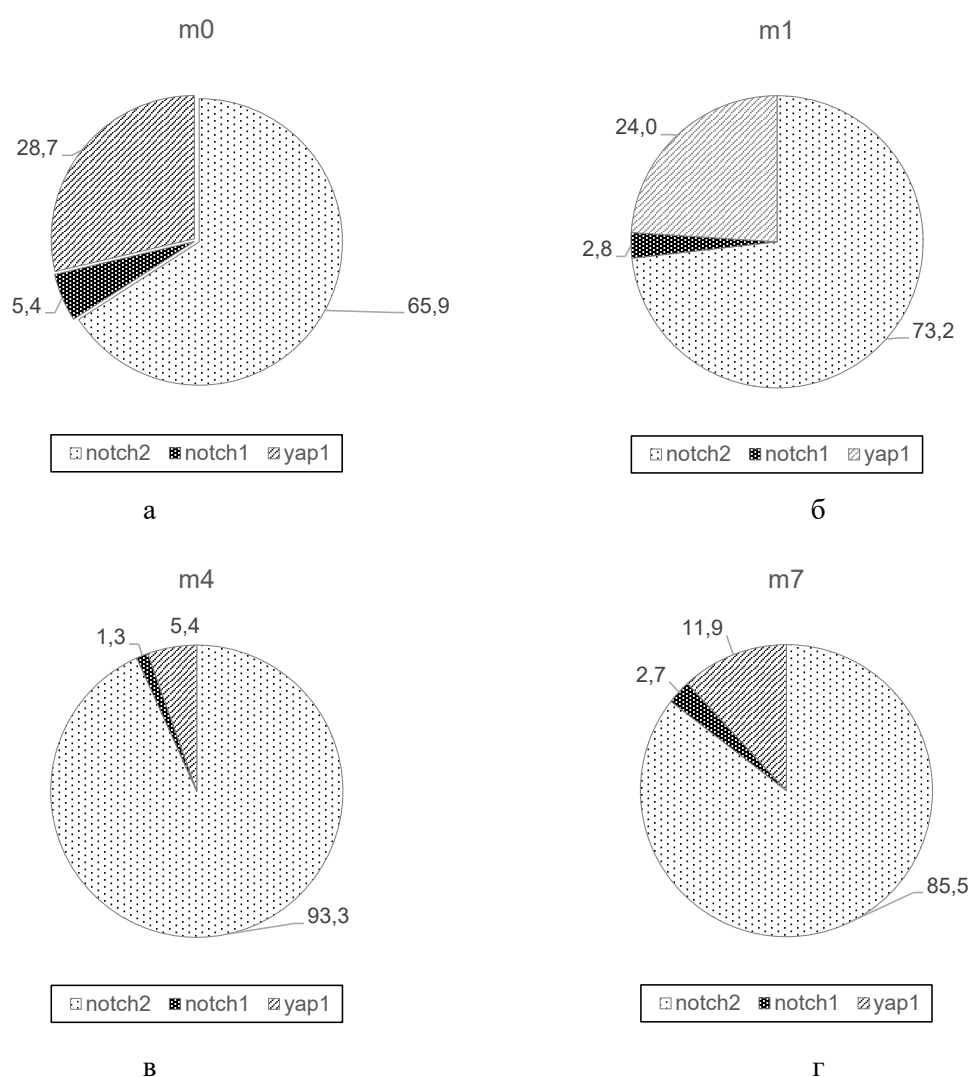


Рисунок 2 – Процентное отношение уровня мРНК генов notch1, notch2, yap1: а – точка m0 (референсные значения, интактные животные), б – точка m1 (первая экспериментальная точка, начало изменений уровня мРНК и морфологических изменений печени), в – точка m4 (пик падения уровня мРНК генов-мишеней, выраженные морфологические патологические изменения), г – точка m7 (развитие цирроза).

количественном эквиваленте (число копий) позволило установить интересный факт о процентном соотношении мРНК генов-мишеней (рис. 2).

Наибольший вклад в процентном отношении мРНК внес относительно стабильный notch2. С начала эксперимента и до его окончания мРНК notch2 доминировали среди изучаемых генов-мишеней – минимальное значение в точке m0 – 65,9%. Существует вероятность того, что незначительные, на первый взгляд, изменения уровня мРНК notch2 могли быть связаны с ее высокой процентной долей. При этом доля мРНК гена notch1 не превышала 5,4% (точка m0) и сократилась в ходе эксперимента более чем в 5 раз, при-

мерно до 1% (точка m4). Интересно, что данные независимой оценки нормализованного уровня мРНК notch1 показали падение всего в 3 раза. Наконец процентная доля yap1. Занимая промежуточное положение между долями notch1 и notch2 – 28,7% в точке m0, также снизилась более чем в 5 раз в точке m4, показав разницу с независимой оценкой (3 раза).

Сравнительный анализ уровня мРНК генов-мишеней и морфологических изменений печени

На основании данных морфологического исследования проводили балльную оценку степени фиброза у всех животных в контрольной

и экспериментальной группах согласно шкале Ishak K.G. Объединение данных об уровне мРНК генов-мишеней и данных морфологического исследования позволило соотнести реальные морфологические изменения в печени с динамикой уровня мРНК (табл. 3).

Интересно отметить, что наибольшее снижение процентных долей уровня мРНК генов notch1 и uap1 приходится на точку m4 (9 неделя эксперимента), характеризующуюся морфологическими изменениями, соответствующими трансформации цирроза в фиброз. При этом для собственно точки перехода фиброза в цирроз (m6, 13 неделя эксперимента) характерен некоторый подъем (откат) процентных долей notch1 (порядка 3 раз) и uap1 (порядка 3 раз). Доля notch2 в тот же период снижается на 20%. К сожалению, на

данный момент остается неясным, связано ли это с активным включением notch2 в патологические процессы, сопряженные с развитием цирроза или стоит рассматривать иные, неочевидные в рамках настоящей работы факторы.

Несмотря на ощутимые различия количественных данных, в целом уровень мРНК генов-мишеней, рассматриваемый отдельно для каждого из них, а также относительная процентная доля этих уровней предлагают нам примерно одинаковый сценарий протекания патологической индукции фиброза с последующим циррозом под действием химического экспериментального агента.

На первом этапе – точки m1 – m3 наблюдается планомерное снижение уровня мРНК генов notch1 и uap1, а со стороны морфологической

Таблица 3 – Сопоставление динамики уровня мРНК (% доля генов-мишеней) и подтвержденных методами морфологии стадий фиброза печени экспериментальных животных

Контрольные точки	Гены-мишени			Балльная оценка степени фиброза печени по шкале Ishak K.G.	Гистологическая характеристика степени выраженности фиброза
	notch2	notch1	uap1		
m0 (база)	65,9	5,4	28,7	F0	Фиброз отсутствует
m1 (3 недели)	73,2	2,8	24,0	F1	Фиброзное расширение портальных трактов с короткими фиброзными септами или без них
m2 (5 недель)	78,7	2,8	18,4	F2/F3	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с короткими фиброзными септами или без них. Единичные мостовидные порто-портальные септы
m3 (7 недель)	82,7	2,3	15,1	F3/F4	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с единичными мостовидными порто-портальными септами, местами с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрными септами
m4 (9 недель)	93,3	1,3	5,4	F4/F5	Период трансформации фиброза в цирроз. Фиброзное расширение большинства портальных трактов с выраженными мостовидными порто-портальными и единичными порто-центрными септами. Диффузная нодулярная перестройка паренхимы (неполный цирроз)
m5 (11 недель)	92,4	1,1	6,5	F5	
m6 (13 недель)	77,2	2,9	20,0	F5/F6	Точка перехода фиброза в цирроз. Многочисленные мостовидные септы с единичными узелками (неполный цирроз). Достоверный цирроз
m7 (15 недель)	85,5	2,7	11,9	F6	Достоверный цирроз
m8 (17 недель)	88,6	1,7	9,6	F6	

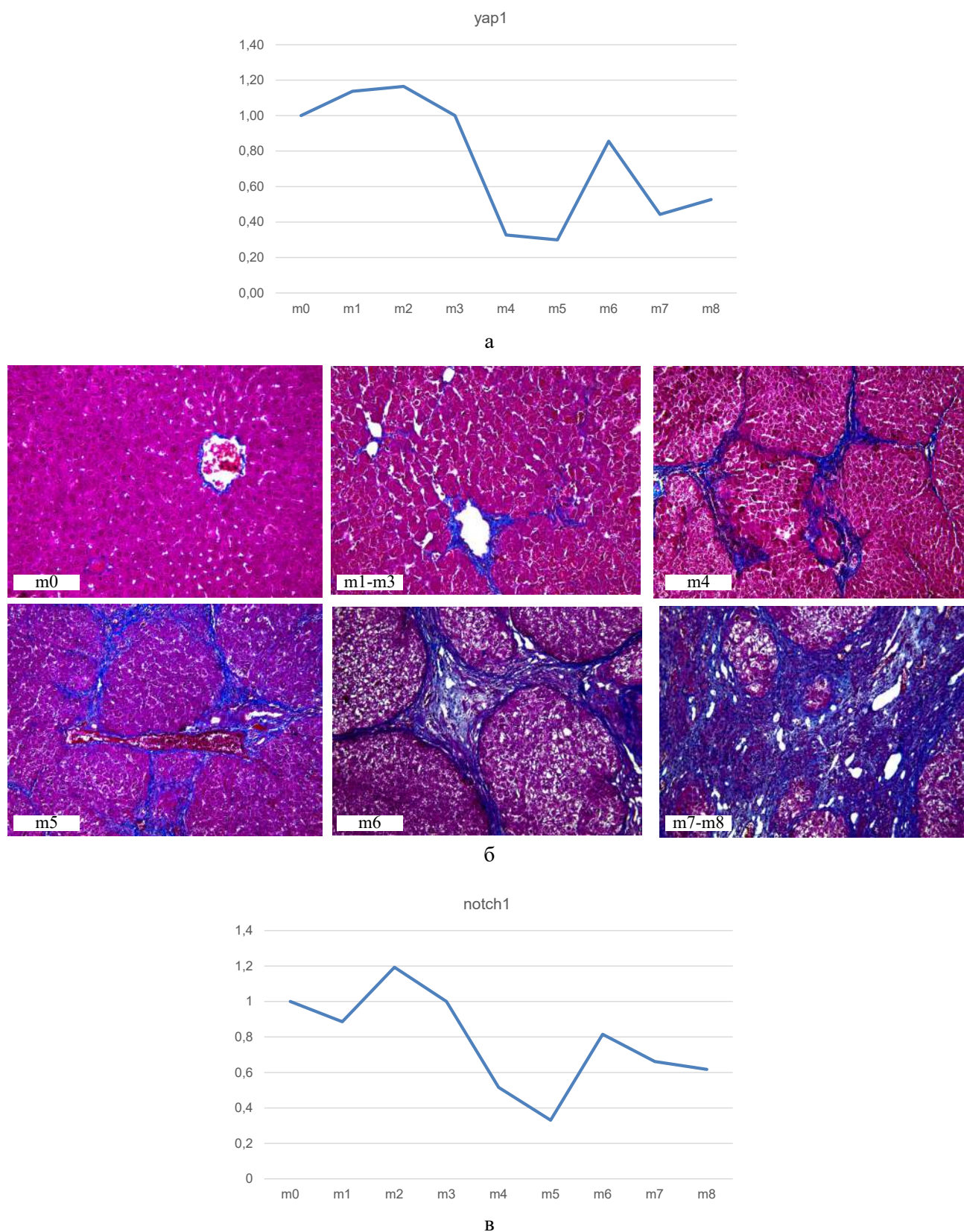


Рисунок 3 – Динамика уровня мРНК генов *yap1* и *notch1* в контексте морфологических изменений в процессе развития фиброза и цирроза в условиях эксперимента: а – динамика уровня мРНК гена *yap1*; б – динамика морфологических изменений печени крыс, окраска по методу Маллори, $\times 200$; в – динамика уровня мРНК гена *notch1*.

оценки печени – развитие признаков фиброза. Далее точки m4 и m5 характеризуются минимальным уровнем мРНК генов notch1 и уар1 при переходе от фиброза к циррозу. Собственно, точка перехода в цирроз (m6) характеризуется неким подъемом уровня мРНК notch1 и уар1, что вскоре снова (m7-m8) сменяется падением. Базовый (m0) уровень мРНК в точке m6 все же не достигается (рис. 3).

Вероятно, отмеченное снижение уровня мРНК гена уар1 в печени экспериментальных животных на 9-11 неделях эксперимента (m4-m5) ингибирует компенсаторно-восстановительные процессы в печени, активирует звездчатые клетки и способствует трансформации фиброза в цирроз.

В ходе проведенного исследования удалось установить, что уровень мРНК генов notch1 и уар1 заметно меняется в точке перехода от нормального состояния тканей печени к развитию фиброза (m0/m1). Далее наблюдается следующий скачок в точке перехода от фиброза к началу изменений, характерных для цирроза (m3/m4). Наконец сопровождает точку перехода фиброза в цирроз (m5/m6). При этом колебания уровня мРНК генов notch1 и уар1 по отношению к m0 практически идентичны и полностью сопоставимы при начале развития фиброза и при наступлении цирроза и не могут позволить различить эти стадии. Однако могут достаточно точно охарактеризовать период начала перехода развитого фиброза в цирроз.

Несмотря на то, что в последние годы широко изучается передача сигналов Notch в печени и других органах, по-прежнему остается много открытых вопросов в понимании роли этого сигнального пути в патологических процессах, приводящих к развитию фиброза и цирроза [8-10].

Заключение

Изучение классического транскрипционного фактора сигнального пути Notch – hes1 при экспериментальном фиброгенезе печени, индуцированном тиацетамидом, показало очень низкую и стабильную его активность во всех изученных образцах. В рамках данного эксперимента ген hes1 не является мишенью пути Notch и может быть использован в качестве референсного гена.

Отмеченное снижение экспрессии активности второго транскрипционного фактора сигнального пути Notch – уар1 на 9-11 неделях эксперимента, вероятно, ингибирует компенсаторно-восстановительные процессы в печени, акти-

вирует звездчатые клетки и способствует трансформации фиброза в цирроз.

Колебания уровня мРНК генов notch1 и уар1 по отношению к стартовой точке (нет изменений в ткани печени) практически идентичны и полностью сопоставимы при начале развития фиброза и при наступлении цирроза и не могут позволить различить эти стадии. Однако они, возможно, могут достаточно точно охарактеризовать период начала перехода развитого фиброза в цирроз и на основании этого могут рассматриваться как потенциальные маркеры перехода фиброза в цирроз.

Информация об источнике поддержки:

Работа выполнена в рамках проекта задания государственной программы научных исследований «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении» (номер государственной регистрации 20190107 от 19.02.2019).

Information about the sources of financing:

The research was conducted within the frames of the theme task of State Research Programs (GPNI) of the Republic of Belarus «To study the role of expression of the NOTCH- and TWEAK signaling pathways genes, participating in the processes of proliferation and differentiation of liver cells in the norm and in case of its toxic damage» (№GR 20190107 of 19.02.2019).

Литература

1. Roehlen, N. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives / N. Roehlen, E. Crouchet, T. F. Baumert // Cells. – 2020 Apr. – Vol. 9, N 4. – P. 875.
2. Cao, Y. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis / Y. Cao, C. Ji, L. Lu // Ann. Transl. Med. – 2020 Apr. – Vol. 8, N 8. – P. 562.
3. Targeting hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis by natural products: is it the dawning of a new era? / Y.-T. Chan [et al.] // Front Pharmacol. – 2020 Apr. – Vol. 11. – P. 548.
4. Bai, X. Recent advances in nanomedicine for the diagnosis and therapy of liver fibrosis / X. Bai, G. Su, S. Zhai // Nanomaterials (Basel.). – 2020 Sep. – Vol. 10, N 10. – P. 1945.
5. Elucidating potential profibrotic mechanisms of emerging biomarkers for early prognosis of hepatic fibrosis / M. Zehra [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2020 Jul. – Vol. 21, N 13. – P. 4737.
6. Bottcher, K. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-

fibrogenic agents / K. Bottcher, M. Pinzani // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2017 Nov. – Vol. 121. – P. 3–8.

7. Bioinformatics-based screening of key genes for transformation of liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma / C. H. Jiang [et al.] // J. Transl. Med. – 2020 Jan. – Vol. 18, N 1. – P. 40.
8. Hu, B. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy / B. Hu, S. H. Phan // Pharmacol. Res. – 2016 Jun. – Vol. 108. – P. 57–64.
9. Adams, J. M. The roles of Notch signaling in liver development and disease / J. M. Adams, H. Jafar-Nejad // Biomolecules. – 2019 Oct. – Vol. 9, N 10. – P. 608.
10. Geisler, F. Emerging roles of Notch signaling in liver disease / F. Geisler, M. Strazzabosco // Hepatology. – 2015 Jan. – Vol. 61, N 1. – P. 382–392.
11. Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF- β /BMP signaling / K. Zhang [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2015 Jan. – Vol. 21, N 3. – P. 878–887.
12. Analysis of Notch and TGF- β signaling expression in different stages of disease progression during hepatitis B virus infection / N. Trehanpati [et al.] // Clin. Transl. Gastroenterol. – 2012 Oct. – Vol. 3, N 10. – e23.

13. Hu, B. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy / B. Hu, S. H. Phan // Pharmacol. Res. – 2016 Jun. – Vol. 108. – P. 57–64.
14. Inhibition of Notch signaling by a γ -secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats / Y. Chen [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 10. – e46512.
15. Adams, J. M. The roles of Notch signaling in liver development and disease / J. M. Adams, H. Jafar-Nejad // Biomolecules. – 2019 Oct. – Vol. 9, N 10. – P. 608.
16. Manmadhan, S. Hippo signaling in the liver – a long and ever-expanding story / S. Manmadhan, U. Ehmer // Front. Cell. Dev. Biol. – 2019 Mar. – Vol. 7. – P. 33.
17. Activation of YAP attenuates hepatic damage and fibrosis in liver ischemia-reperfusion injury / Y. Liu [et al.] // J. Hepatol. – 2019 Oct. – Vol. 71, N 4. – P. 719–730.
18. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial / J. E. Everhart [et al.] // Hepatology. – 2010 Feb. – Vol. 51, N 2. – P. 585–594.
19. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // Methods. – 2001 Dec. – Vol. 25, N 4. – P. 402–408.

Поступила 03.02.2021 г.

Принята в печать 15.04.2021 г.

References

1. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives. Cells. 2020 Apr;9(4):875. doi: 10.3390/cells9040875
2. Cao Y, Ji C, Lu L. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis. Ann Transl Med. 2020 Apr;8(8):562. doi: 10.21037/atm.2020.02.119
3. Chan Y-T, Wang N, Tan HY, Li S, Feng Y. Targeting hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis by natural products: is it the dawning of a new era? Front Pharmacol. 2020 Apr;11:548. doi: 10.3389/fphar.2020.00548
4. Bai X, Su G, Zhai S. Recent advances in nanomedicine for the diagnosis and therapy of liver fibrosis. Nanomaterials (Basel). 2020 Sep;10(10):1945. doi: 10.3390/nano10101945
5. Zehra M, Curry JC, Pillai SS, Lakhani HV, Edwards CE, Sodhi K. Elucidating potential profibrotic mechanisms of emerging biomarkers for early prognosis of hepatic fibrosis. Int J Mol Sci. 2020 Jul;21(13):4737. doi: 10.3390/ijms21134737
6. Bottcher K, Pinzani M. Pathophysiology of liver fibrosis and the methodological barriers to the development of anti-fibrogenic agents. Adv Drug Deliv Rev. 2017 Nov;121:3-8. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.016
7. Jiang CH, Yuan X, Li JF, Xie YF, Zhang AZ, Wang XL, et al. Bioinformatics-based screening of key genes for transformation of liver cirrhosis to hepatocellular carcinoma. Transl Med. 2020 Jan;18(1):40. doi: 10.1186/s12967-020-02229-8
8. Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. Pharmacol Res. 2016 Jun;108:57-64. doi: 10.1016/j.phrs.2016.04.010
9. Adams JM, Jafar-Nejad H. The roles of Notch signaling in liver development and disease. Biomolecules. 2019 Oct;9(10):608. doi: 10.3390/biom9100608

10. Geisler F, Strazzabosco M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. Hepatology. 2015 Jan;61(1):382-92. doi: 10.1002/hep.27268
11. Zhang K, Zhang Y-Q, Ai W-B, Hu Q-T, Zhang Q-J, Wan L-Y, et al. Hes1, an important gene for activation of hepatic stellate cells, is regulated by Notch1 and TGF- β /BMP signaling. World J Gastroenterol. 2015 Jan;21(3):878-87. doi: 10.3748/wjg.v21.i3.878
12. Trehanpati N, Shrivastav S, Shivakumar B, Khosla R, Bhardwaj S, Chaturvedi J, et al. Analysis of Notch and TGF- β signaling expression in different stages of disease progression during hepatitis B virus infection. Clin Transl Gastroenterol. 2012 Oct;3(10):e23. doi: 10.1038/ctg.2012.17
13. Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. Pharmacol Res. 2016 Jun;108:57-64. doi: 10.1016/j.phrs.2016.04.010
14. Chen Y, Zheng S, Qi D, Zheng S, Guo J, Zhang S, et al. Inhibition of Notch signaling by a γ -secretase inhibitor attenuates hepatic fibrosis in rats. PLoS One. 2012;7(10):e46512. doi: 10.1371/journal.pone.0046512
15. Adams JM, Jafar-Nejad H. The roles of Notch signaling in liver development and disease. Biomolecules. 2019 Oct;9(10):608. doi: 10.3390/biom9100608
16. Manmadhan S. Hippo signaling in the liver - a long and ever-expanding story. Front Cell Dev Biol. 2019 Mar;7:33. doi: 10.3389/fcell.2019.00033
17. Liu Y, Lu T, Zhang C, Xu J, Xue Z, Busuttill RW, et al. Activation of YAP attenuates hepatic damage and fibrosis in liver ischemia-reperfusion injury. J Hepatol. 2019 Oct;71(4):719-730. doi: 10.1016/j.jhep.2019.05.029
18. Everhart JE, Wright EC, Goodman ZD, Dienstag JL, Hoefs JC, Kleiner DE, et al. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. Hepatology. 2010

Feb;51(2):585-94. doi: 10.1002/hep.23315

19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and

the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Submitted 03.02.2021

Accepted 15.04.2021

Сведения об авторах:

Щастный А.Т. – д.м.н., профессор кафедры госпитальной хирургии с курсом ФПК и ПК, ректор Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>;

Лебедева Е.И. – к.б.н., доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>;

Бабенко А.С. – к.х.н., доцент кафедры биоорганической химии, Белорусский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>.

Information about authors:

Shchastniy A.T. – Doctor of Medical Sciences, professor of the Chair of Hospital Surgery with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, rector of Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2796-4240>;

Lebedeva E.I. – Candidate of Biological Sciences, associate professor of the Chair of Histology, Cytology & Embryology, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1309-4248>;

Babenka A.S. – Candidate of Chemical Sciences, associate professor of the Chair of Bioorganic Chemistry, Belarusian State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5513-970X>.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии. E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Лебедева Елена Ивановна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Histology, Cytology and Embryology. E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru – Elena I. Lebedeva.